

С.Л. Кузнецов², В.Г. Лихванцева¹, Е.В. Арутюнян¹, К.А. Кузьмин¹, С.А. Сельков³, Д.И. Соколов³¹ Московский государственный университет им. М.И. Ломоносова, Российская Федерация² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Российская Федерация³ Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Изучение возможности регуляции ангиогенеза *in vitro* с помощью рекомбинантных фрагментов ингибиторов ангиогенеза эндостатина, тумстатина и PEDF

Неоваскулярные заболевания органа зрения, такие как возрастная макулярная дегенерация, ретинопатия недоношенных, диабетическая ретинопатия, тромбозы центральной вены сетчатки и ее ветвей, неоваскулярная глаукома, опухоли хориоидеи и сетчатки, занимают лидирующие позиции в перечне офтальмопатологий, приводящей к слепоте и инвалидизации, а также к социальной и психологической дезадаптации. Арсенал ангиостатических препаратов в практической офтальмологии скуден. Цель настоящей работы заключалась в изучении возможности регуляции ангиогенеза *in vitro* с помощью рекомбинантных фрагментов природных ингибиторов ангиогенеза эндостатина, тумстатина и PEDF (pigment epithelial derived factor) и применения их в качестве потенциально возможных фармакологически активных субстанций. Установлено, что *in vitro* эндостатин, тумстатин и PEDF, как и препарат сравнения бевацизумаб, оказывают про- или антиангиогенное действие. Направленность биологического эффекта зависит от условий культивирования, концентрации пептида в культуральной жидкости и этапа ангиогенеза.

Ключевые слова: неоваскулярные заболевания органа зрения, стимуляторы и ингибиторы ангиогенеза, эндостатин, тумстатин, PEDF. (Вестник РАМН. 2013; 4:63–67)

63

Введение

Известно, что патологический ангиогенез в оптически прозрачных структурах глаза (роговица, стекловидное тело) или на глазном дне (сетчатке, хориоидеи) приводит к анатомо-физиологическим и функциональным нарушениям оптической системы органа зрения, определяя исход заболевания. В связи с этим изучение механизмов и

возможности регуляции ангиогенеза как способа терапевтического ремоделирования оптически прозрачных тканей глаза имеет стратегически важное значение. Между тем механизмы терапевтической регуляции ангиогенезом в офтальмологии малоизучены. Исходя из общих закономерностей развития сосудов, известно, что ангиогенез происходит как при избытке его стимуляторов и/или дефиците ингибиторов, так и при дефиците стимуляторов

S.L. Kuznetsov², V.G. Likhvantseva¹, E.V. Arutyunyan¹, K.A. Kuzmin¹, S.A. Selkov³, D.I. Sokolov³¹ Lomonosov Moscow State University, Russian Federation² Sechenov First Moscow State Medical University, Russian Federation³ D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, St. Petersburg, Russian Federation

Investigation of Possible Approaches to Angiogenesis Regulation *in vitro* with the Help of Recombinant Fragments of Angiogenesis Inhibitors such as Endostatin, Tumstatin and PEDF

Neovascular diseases of visual organ such as age-related macular degeneration, retinopathy of prematurity, diabetic retinopathy, thrombosis of central retina vein and its branches, neovascular glaucoma, choroid and retina tumors have the leading positions in the list of ophthalmopathologies that result in blindness and incapacity. The variety of angiostatic medications of applied ophthalmology is scant. The aim of work was to study the possible approaches to angiogenesis regulation *in vitro* with the help of recombinant fragments of natural inhibitors of angiogenesis such as endostatin, tumstatin and PEDF (pigment epithelial derived factor), and also their ability to be the base of potentially feasible and pharmacologically active substances. It is determined that endostatin, tumstatin and PEDF, as well as the comparison medication Bevacizumab *in vitro* have pro- or antiangiogenic influence. The direction of the biological effect depends on the cultivation conditions, peptide concentration in the cultural fluid and stage of angiogenesis.

Key words: neovascular diseases of visual organ, inhibitors and stimulators of angiogenesis, endostatin, tumstatin, PEDF.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2013. 4: 63–67)

и/или избытке ингибиторов [1–5]. Однако современный арсенал ангиостатических препаратов практического офтальмолога невелик. Официально разрешены только 2 препарата — пегаптаниб и ранибизумаб. Препарат бевацизумаб остается средством off label, т.е. назначается не по зарегистрированным показаниям [6, 7]. Перечисленные фармакологические средства имеют узкую таргетную направленность: они ингибируют, блокируют или препятствуют реализации биологических эффектов, направленных на запуск ангиогенеза. Их единственной мишенью служит проангиогенная молекула фактора роста сосудов VEGF или рецептор к нему. Иными словами, они несут VEGF-зависимый механизм действия [8–10].

По мере накопления клинического опыта применения пегаптаниба все чаще появляются сообщения о существовании категории лиц, у которых доказано явление природной тахифилаксии, и он исходно неэффективен [11]. Кроме того, в ряде исследований подтверждено снижение лечебного эффекта препаратов при повторных инъекциях. В частности, установлено, что после трех инъекций лечебный эффект бевацизумаба снижается вдвое [12, 13]. Рассматриваются механизмы этого феномена. Ответственность за его развитие возлагают на толерантность и/или тахифилаксию. Обоснована необходимость поиска и разработки альтернативных терапевтических стратегий, в связи с чем представляется перспективным изучение возможности регуляции ангиогенеза на основе применения природных ингибиторов. Мишенями для такой антиангиогенной терапии могут быть эндотелиальные клетки, регуляторные молекулы, участвующие в ангиогенезе, рецепторы к ним или гены, отвечающие за синтез про- и/или антиангиогенных пептидов. Соответственно, блокировка их активности возможна не только с помощью моноклональных антител к VEGF, но и посредством молекул с противоположными эффектами, направленными на подавление проангиогенных стимулов и создаваемых с помощью инновационных биотехнологий. В этом аспекте представляет научный и практический интерес исследование биологических эффектов природных пептидов-регуляторов (или рекомбинантных фрагментов этих пептидов) и механизмов управления ангиогенезом на их основе.

Цель исследования: изучить возможности регуляции ангиогенеза *in vitro* с помощью рекомбинантных фрагментов природных ингибиторов ангиогенеза эндостатина, тумстатина и PEDF.

Материалы и методы

Материал для исследования

Для тестирования был предоставлен блок антиангиогенных препаратов, состоящий из трех рекомбинантных пептидов: тумстатина (фрагмент белка 69–95), эндостатина (фрагмент белка 1–49) и фактора дифференцировки пигментного эпителия сетчатки-PEDF (фрагмент белка 24–57). Препараты были получены методом генной инженерии в лаборатории биотехнологии Научно-исследовательского института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемкина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Возможность и механизмы регуляции ангиогенеза изучали *in vitro* на различных моделях ангиогенеза, отражающих этапы сборки сосудистой сети.

Условия культивирования: среда DMEM/F12 (Sigma, США) служила основой; 10% от общего объема среды составляла инактивированная телячья эмбриональ-

ная сыворотка (ТЭС, Sigma, США). В среду добавляли 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, США), 2 ммоль L-глутамин (ICN, США) и НАТ (Sigma, США).

Культивировали человеческие эндотелиальные клетки (ЭК) линии EA.Hy926 при 37 °C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂. Линия EA.Hy926 является адгезионной культурой, поэтому требовала пересева 1 раз в 3–4 дня. Пересев осуществляли по общепринятой методике, вызывая дезинтеграцию монослоя 5–10-минутной экспозицией в растворе Версена (Биолот, Россия). Использовали пластиковые флаконы (Sarstedt, Австрия).

Методы исследования

Жизнеспособность клеток линии EA.Hy926 определяли при помощи раствора трипанового синего; она составляла 95–97%.

Биологическую активность пептидов *in vitro* проверяли в тестах: цитотоксических, пролиферационных, оценивали миграцию и способность ЭК к формированию капиллярноподобных структур. Тестирование проводили в лаборатории иммунологии с отделением изучения ангиогенеза НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН.

Антипролиферативную активность препаратов определяли модифицированным «митогенным» методом с использованием красителя Crystalviolet на культуре клеток линии EA.Hy926. Результаты выражали в единицах оптической плотности. Об изменении пролиферативной активности клеток судили по оптической плотности пробы, сравнивая ее с показателями в базовом, положительном и дополнительном контролях.

Антимиграционную активность пептидов оценивали по их способности подавлять миграцию ЭК. Препараты тестировали с помощью модифицированного метода «раневой поверхности».

Миграционная активность ЭК выражалась двумя показателями:

- разницей ширины линии разрушенного монослоя после миграции клеток в опыте по сравнению с контролем;
- разницей числа мигрировавших клеток в зону разрушенного монослоя в опыте по отношению к контролю (клетки в среде DMEM/F12, содержащей 10% ТЭС), выраженной в пикселях.

Способность препаратов подавлять формирование капиллярноподобных структур ЭК EA.Hy926 оценивали в матригель-природном матриксе базальных мембран. В качестве количественных показателей использовали длину образованных клеточных тяжей в пикселях, число клеточных тяжей и число клеточных агрегатов с отходящими клеточными тяжями (табл. 1).

Антипролиферативную активность пептидов изучали в концентрации от 10 240 до 2,5 нМ. Антимиграционную активность тумстатина определяли в диапазоне концентраций от 10240 до 1280 нМ, эндостатина — от 10240 до 640 нМ, PEDF — от 320 до 20 нМ. Выбор диапазона значений основывался на результатах предыдущего теста (на пролиферацию) и определении биологически значимых концентраций.

Влияние пептидов на процесс образования капиллярноподобных структур изучали в концентрациях, подавляющих миграцию ЭК линии EA.Hy926: для тумстатина — 1250, 2500, 5000, 10 000 нМ; для эндостатина — 1250, 2500, 5000, 10 000 нМ; для PEDF — 20, 40, 80, 160 нМ.

Во избежание ложноположительных и ложноотрицательных результатов полученные данные сопоставляли

Таблица 1. Образование капилляроподобных структур эндотелиальных клеток линии EA.Hy926, M±m

Культивирование эндотелиальных клеток линии EA.Hy926 в присутствии компонентов:	Средняя длина тяжей, образованных эндотелиальными клетками линии EA.Hy926, пиксели	Число тяжей, образованных эндотелиальными клетками линии EA.Hy926	Число агрегатов, образованных эндотелиальными клетками линии EA.Hy926
Среда DMEM/F12 с добавлением 2,5% ТЭС (спонтанный уровень)	182,7±2,4	63,8±2,1	50,1±2,3
Бевацизумаб, 5 нМ	165,2±2,3***	73,3±3,1*	59,1±2,6**
Тумстатин 1250 нМ	169,1±5,6*	40,8±2,6***	30,9±2,4***
Тумстатин 2500 нМ	160,6±7,4**	34,6±2,1***	24,3±1,4***
Тумстатин 5000 нМ	154,1±10,2***	28,0±2,2***	20,9±1,3***
Тумстатин 10000 нМ	213,7±7,5***	41,4±3,3***	32,1±2,4***
Эндостатин 1250 нМ	154,1±2,7***	76,2±5,6*	65,1±5,7***
Эндостатин 2500 нМ	153,4±3,4***	71,1±7,0	59,8±6,4***
Эндостатин 5000 нМ	182,5±4,0	66,5±6,0	56,4±5,4***
Эндостатин 10000 нМ	183,1±4,0	55,9±5,9	47,1±5,3
PEDF, 20 нМ	187,3±4,4***	48,8±3,9**	37,7±4,2**
PEDF, 40 нМ	101,4±11,1***	10,9±5,6***	5,5±3,4***
PEDF, 80 нМ	72,4±14,0***	5,2±3,9***	3,6±2,9***
PEDF, 160 нМ	183,4±8,1	28,8±10,4***	22,2±8,0***

Примечание. Различия статистически значимы по сравнению с базовым уровнем: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

с т.н. базовым контролем, положительным контролем и дополнительным контролем.

Базовым контролем для всех концентраций тестируемых пептидов, приготовленных на среде DMEM/F12 с добавлением 2,5, 5 и 10% ТЭС, служила культуральная среда без пептида.

Установлено, что более высокие концентрации ТЭС (5, 10%) в среде для культивирования ЭК *in vitro* оказывают стимулирующий пролиферацию эффект; они приравнены к факторам роста, поэтому их относили к т.н. положительному контролю.

Антиангиогенный эффект исследуемых пептидов сравнивали не только между собой, но и с бевацизумабом. Препарат представляет собой рекомбинантное полно-размерное гуманизированное моноклональное антитело к VEGF с доказанным антиангиогенным эффектом в концентрации от 10 240 до 2,5 нМ. Присутствие бевацизумаба позволяло сопоставить ангиостатический эффект препарата с известными механизмами действия с эффектами тестируемых пептидов. Бевацизумаб выступал в качестве дополнительного контроля. Полученные *in vitro* результаты тестирования пептидов сопоставляли с таковыми для бевацизумаба.

Статистическая обработка данных

Результаты настоящего исследования анализировали с помощью пакета прикладных статистических программ SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., США) с применением стандартных алгоритмов вариационной статистики, включая различные типы межгруппового сравнения параметров распределения изучаемых показателей. Межгрупповые различия показателей, измеренных по интервальной шкале, рассчитывали методом t-критерия Стьюдента для независимых выборок.

Результаты и обсуждение

Установлено, что в зависимости от концентрации пептида и содержания ТЭС в культуральной среде все тестируемые пептиды и препарат сопоставления бевацизумаб оказывали про- или антиангиогенное влияние на различных этапах ангиогенеза на культуре клеток EA.Hy926 *in vitro*.

Эндостатин подавлял пролиферацию ЭК линии EA.Hy926 в концентрациях 2,5, 5, 5120, 10 240 нМ (5% ТЭС), ингибировал миграцию в концентрациях 1280, 10240 (5% ТЭС), 2560 и 5120 нМ (10% ТЭС) (рис.1); ингибировал формирование капилляроподобных структур в концентрациях 1250 и 2500 нМ (при 5 и 10% ТЭС). Стимулирующий эффект эндостатина заключался в индукции пролиферации; он выявлялся в концентрациях 80 и 160 нМ в условиях 2,5% ТЭС.

Тумстатин подавлял пролиферацию ЭК линии EA.Hy926 в концентрациях 2560 и 10 240 нМ (5% ТЭС), не влиял на миграцию ЭК ни при каких условиях, ингибировал формирование комплексной питательной среды (КПС) в концентрациях 1250, 2500, 5000 и 10 000 нМ. Стимулирующий эффект тумстатина проявлялся на этапе пролиферации в концентрации 80 нМ при культивировании ЭК линии EA.Hy926 в условиях 5% ТЭС.

PEDF ингибировал пролиферацию в концентрациях 20, 40, 80 и 160 нМ (5% ТЭС), формирование КПС происходило при концентрациях 20, 40, 80 нМ. PEDF стимулировал миграцию в концентрациях 20, 40, 80 нМ в условиях 5 и 10% ТЭС (см. рис. 1).

Следует отметить, что препарат бевацизумаб проявил стимулирующий эффект на культуре эндотелиальных клеток линии ЭК линии EA.Hy926 на этапе пролиферации в концентрациях 40, 80, 160, 320 (5% ТЭС) и 640 нМ (2,5% ТЭС). При этом он ингибировал пролиферацию ЭК линии EA.Hy926 в концентрациях 2,5, 5, 10, 20 (2,5, 5 и 10% ТЭС), 640, 1280, 2560, 5120, 10 240 нМ (5 и 10% ТЭС), тормозил миграцию в концентрации 5 нМ (10% ТЭС) и ингибировал КПС в концентрации 5 нМ.

Сравнительная оценка биологической активности показала, что в концентрации 160 нМ (10% ТЭС) рекомбинантный пептид PEDF подавляет пролиферацию эндотелиальных клеток линии EA.Hy926 в 4 раза сильнее, чем бевацизумаб (рис. 2).

Таким образом, принимая во внимание биологические дозозависимые свойства тестируемых пептидов, раскрывались потенциальные механизмы регуляции ангиогенеза на различных его этапах.

Используя международную систему тестирования про- и антиангиогенных препаратов, были определены биологические эффекты рекомбинантных пептидов

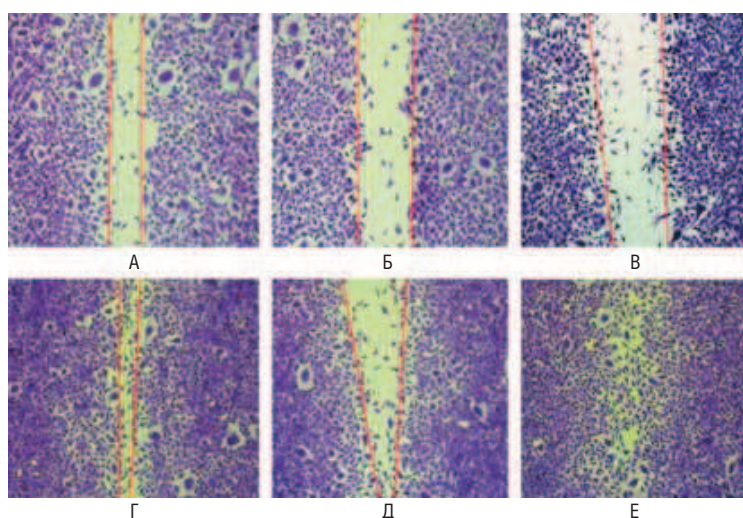


Рис. 1. Влияние пептидов эндостатина и PEDF на миграционную активность эндотелиальных клеток линии EA.Hy926 (метод «раневой поверхности»). А — ширина нарушенного монослоя в культуре эндотелиальных клеток без добавления эндостатина с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки. Б — ширина нарушенного монослоя в культуре эндотелиальных клеток с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки и 5 нМ бевацизумаба. В — ширина нарушенного монослоя в культуре эндотелиальных клеток с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки и 5120 нМ эндостатина. Г — ширина нарушенного монослоя в культуре эндотелиальных клеток без добавления PEDF с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки. Д — ширина нарушенного монослоя в культуре эндотелиальных клеток с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки и 5 нМ бевацизумаба. Е — ширина нарушенного монослоя в культуре эндотелиальных клеток с 80 нМ PEDF.

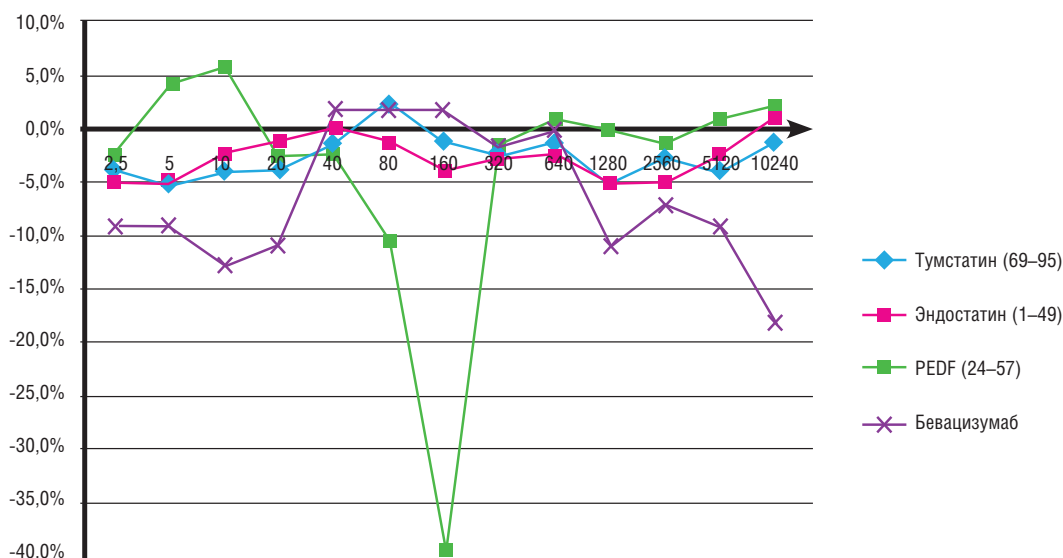


Рис. 2. Сравнительный анализ влияния исследуемых пептидов и препарата бевацизумаб на пролиферативную активность эндотелиальных клеток линии EA.Hy926 в присутствии 10% ТЭС (в % отношении к исходному значению оптической плотности).

и сопоставлены с ангиостатическим препаратом бевацизумабом, обладающим известным механизмом действия. Все пептиды продемонстрировали биологическую дозозависимую активность на разных этапах развития ангиогенеза. Направленность эффекта (проангиогенная или ангиостатическая) зависела от концентрации пептида и содержания ТЭС в культуральной жидкости, а также этапа ангиогенеза. Это объясняет противоречивые данные, представленные в литературе при аналогичных исследованиях, проведенных с природными полноразмерными белками.

Следует отметить, что слабый проангиогенный эффект на этапе миграционной активности ЭК выявлен в присутствии бевацизумаба в концентрациях 40, 80, 160 и 640 нМ и добавлении 5% ТЭС. На первый взгляд, сложно утверждать, вызван ли столь парадоксальный результат стимулирующим эффектом бевацизумаба,

или он обусловлен недостаточным ингибирующим эффектом, направленным не только на подавление природной скорости миграции ЭК, но и на нейтрализацию стимулирующего действия 5% ТЭС. Вместе с тем, учитывая что конечный результат в опыте сравнивали с положительным контролем, в качестве которого выступали культивированные ЭК в среде с добавлением 5% ТЭС, можно склоняться к версии о том, что в некоторых ситуациях возможна фармакологическая стимуляция ангиогенеза препаратами ангиостатической направленности. В качестве доказательства могут выступить уменьшение длины клеточных тяжей при одновременном увеличении числа клеточных тяжей и числа клеточных агрегатов по сравнению со спонтанным уровнем, что, возможно, свидетельствует о переключении ЭК на разветвляющийся тип ангиогенеза на этапе формирования капилляроподобных

структур (см. табл. 1). Клинический опыт подтверждает развитие такого сценария событий.

Заключение

Известно, что чем шире спектр биологических возможностей пептида, тем перспективнее этот пептид. В этом аспекте природные ингибиторы ангиогенеза потенциально имеют явное преимущество перед узконаправленными ингибиторами VEGF. Вместе с тем уже на этом уровне знаний очевидно, что необходим фундаментальный комплексный подход с изучением биологического эффекта комбинаций нескольких пептидов. Известно, что патологический ангиогенез в условиях продолжающейся ишемии и/или неопластического заболевания является непрерывным процессом, при котором в любой из временных точек присутствуют разные стадии ангиогенеза. Один и тот же пептид-регулятор может тормозить один этап ангиогенеза, стимулируя другой. Таким образом, комплексный подход с применением нескольких пептидов-регуляторов, действующих на разные этапы ангиогенеза, может оказаться более перспективным фармакологическим направлением.

Представленные результаты отражали первый этап тестирования пептидов, вторым этапом предстоит определить биологический потенциал природных ингибиторов ангиогенеза на экспериментальных моделях роговичного ангиогенеза у лабораторных животных.

Фармакологическая регуляция ангиогенеза предполагает реализацию ряда механизмов, определяющих скорость и полноценность процесса образования новых сосудов, варьирующих от способности потенцировать пролиферацию, миграцию и образование КПС до ингибирования или блокировки отдельных этапов ангиогенеза. Изучение влияния на эти этапы фрагментов природных ингибиторов ангиогенеза, являющихся компонентом экстрацеллюлярного матрикса, представляется довольно перспективным направлением в медицине. Кроме того, полученные результаты могут способствовать разработке патогенетически ориентированных методов лечения неоваскулярных заболеваний. В литературе практически отсутствуют фундаментальные данные, отражающие рычаги управления недостаточным ангиогенезом или ингибированием избыточного ангиогенеза. Между тем спектр заболеваний, при которых эта информация крайне необходима, чрезвычайно широк.

REFERENCES

1. Zhukov N.V. *Prakt. onkol. — Practical Oncology*, 2007; 8 (3): 164–170.
2. Ziangirova G.G., Likhvantseva V.G. Osobennosti i rol' angiogeneza v opukholyakh. V kn: *Opukholi sosudistogo trakta glaza* [Features and role of angiogenesis in tumors. In: Tumors of eyes vascular tract]. Moscow; Poslednee slovo; 2003. p. 456.
3. Ellington A.D., Szostak J.W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990; 346: 818–822.
4. Eyetech Study Group: Preclinical and phase IA clinical evaluation of anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina*. 2002; 22: 143–152.
5. Folkman J. Tumor angiogenesis: Cancer Medicine. J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, R.R. Weichselbaum (eds.). *Baltimore: Williams & Wilkins*. 1997. P. 181–204.
6. Paccola L., Costa R.A., Folgosa M.S., Barbosa J.C., Scott I.U., Jorge R. Intravitreal triamcinolone versus bevacizumab for treatment of refractory diabetic macular oedema (IBEME study). *Brit. J. Ophthalmology*. 2008; 92: 76–80.
7. Presta L.G., Chen H., O'Connor S.J., Chisholm V., Meng Y.G., Krummen L. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumor and other disorders. *Cancer Res*. 1997; 57: 4593–4599.
8. Colella P., Corugno G., Auricchio A. Ocular gene therapy: current progress and future prospects. *Trends in Molecular Medicine*. 2008; 15 (1): 23–31.
9. Developments in Ophthalmology. Anti-VEGF. F. Bandello, M. Battaglia-Parodi (eds.). *Karger—Basel*. 2010. 144 p.
10. Noel A., Lost M., Lambert V. Lecomte J., Marie Rakic J. Anti-angiogenic therapy of exudative age-related macular degeneration: current progress and emerging concepts. *Trends Mol. Med*. 2007; 13 (8): 345–352.
11. Lux A., Llacer H., Heussen F. et al. Non-responders to bevacizumab (Avastin) therapy of choroidal neovascular lesions. *Brit. J. Ophthalmol*. 2007; 91 (10): 1318–1322.
12. Eghoj M.S., Sorensen T.L. Tachyphylaxis during treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. *Brit. J. Ophthalmol*. 2011; 96: 21–23.
13. Schaal S., Kaplan H.J., Tetzl T.H. Is there tachyphylaxis to intravitreal anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy in age-related macular degeneration? *Ophthalmology*. 2008; 115: 2199–2205.

FOR CORRESPONDENCE

Kuznetsov Sergei Evovich, RAMS cor. member, Head of the Department of Innovative Development of Science Russian Academy of Medical Sciences

Address: 109240, Moscow, Soljanka St., 14; **tel.:** 8(495) 698-56-31; **e-mail:** kuznetsov@ramn.ru

Likhvantseva Vera Gennad'evna, PhD, Professor, Department of Fundamental Medicine Lomonosov Moscow State University

Address: 119192, Moscow Lomonosov Ave, 31/5; **tel:** (495) 932-88-14; **e-mail:** info@fbm.msu.ru

Sel'kov Sergey Alekseevich, PhD, Professor, Head of the Immunology Laboratory, Research Institute of Obstetrics and Gynecology named after D.O. Otta

Address: 199034, St. Petersburg, Mendeleev line 3; **tel.:** (812) 328-14-02; **e-mail:** iagmail@ott.ru

Arutyunyan Elena Vladimirovna, Ophthalmologist, City Hospital in Yubileiny

Address: 141090, Moscow region, Yubileiny, Lesnaya St., 8/10; **tel.:** 8(498)-646-96-80; **e-mail:** ev1012@ya.ru

Kuz'min Kirill Anatol'evich, Pathologist, Pathology Department of the Central Clinical Hospital Russian Academy of Sciences

Address: 119333, Moscow, Litovskiy Blvd, 1A; **tel.:** (495) 921-34-74

Sokolov Dmitriy Igorevich, PhD, Head of the Group of Angiogenesis Study of Immunology Laboratory, Research Institute of Obstetrics and Gynecology named after D.O. Otta

Address: 199034, St. Petersburg, Mendeleev line 3; **tel.:** (812) 328-14-02; **e-mail:** iagmail@ott.ru